



## 50ヘルツ磁場がもたらす細胞酸化ストレスの研究

著者	中山 希祐
号	74
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	理博第3023号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00121163">http://hdl.handle.net/10097/00121163</a>

論文内容要旨

氏 名	中山 希祐	提出年	平成 28 年
学位論文の 題 目	50 ヘルツ磁場がもたらす細胞酸化ストレスの研究		

論文目次

1	序論
1.1	生体、生体物質と電磁場の相互作用概論
1.1.1	地磁気を感受する生物
1.1.2	化学的・生化学的側面の先行研究
1.2	生体への磁場影響の重要性
1.2.1	低周波磁場
1.2.2	ラジオ波とマイクロ波磁場
1.3	本研究の位置付けと流れ
2	低周波磁場曝露による遺伝毒性評価
2.1	本研究の背景
2.2	材料と方法
2.2.1	実験に用いた材料等
2.2.2	実験で用いたバッファー
2.2.3	細胞培養
2.2.4	磁場曝露装置
2.2.5	磁場曝露条件
2.2.6	コメットアッセイによる DNA 損傷度測定
2.2.7	DNA 損傷度の解析方法
2.2.8	統計処理
2.3	結果と考察
2.3.1	コイルによる差の有無を調べる実験
2.3.2	連続波形磁場曝露実験
2.3.3	断続波形磁場曝露実験
2.4	まとめ
3	酸化ストレス物質存在下における低周波磁場による DNA 損傷測定
3.1	本研究の背景
3.2	材料と方法
3.2.1	実験に用いた材料等
3.2.2	実験で用いたバッファー
3.2.3	細胞培養

- 3.2.4 LPS 添加
- 3.2.5 磁場曝露装置
- 3.2.6 磁場条件
- 3.2.7 マイクロプレートリーダー
- 3.2.8 コメットアッセイによる DNA 損傷度測定
- 3.2.9 コメット画像解析
- 3.2.10 総細胞数測定
- 3.2.11 カスパーゼ活性測定
- 3.2.12 ネクロシス測定
- 3.2.13 統計解析
- 3.3 結果と考察
  - 3.3.1 DNA 損傷度
  - 3.3.2 総細胞総数測定
  - 3.3.3 カスパーゼ活性測定
  - 3.3.4 ネクロシス測定
- 3.4 まとめ
- 4 酸化ストレス下の浮遊細胞における低周波磁場による生理活性測定
  - 4.1 本研究の背景
  - 4.2 材料と方法
    - 4.2.1 実験に用いた材料等
    - 4.2.2 細胞培養
    - 4.2.3 LPS 刺激
    - 4.2.4 磁場曝露
    - 4.2.5 磁場曝露装置
    - 4.2.6 磁場条件
    - 4.2.7 マイクロプレートリーダー
    - 4.2.8 総細胞数測定
    - 4.2.9 細胞生存率測定
    - 4.2.10 カスパーゼ活性測定
    - 4.2.11 O<sub>2</sub> - 産生量測定
    - 4.2.12 ミトコンドリア膜電位測定
    - 4.2.13 統計解析
  - 4.3 結果と考察
    - 4.3.1 総細胞数測定
    - 4.3.2 カスパーゼ活性測定
    - 4.3.3 細胞死亡率測定
    - 4.3.4 O<sub>2</sub> - 産生量測定
    - 4.3.5 ミトコンドリア膜電位測定
  - 4.4 まとめ

5	付録1 低周波磁場による生体影響と鉄の関連性
5.1	本研究の背景
5.2	材料と方法
5.2.1	実験に用いた化学物質
5.2.2	実験で用いたバッファー
5.2.3	細胞培養
5.2.4	鉄イオン添加
5.2.5	磁場曝露装置
5.2.6	実験で用いたバッファー
5.2.7	磁場条件
5.2.8	コメットアッセイによる DNA 損傷度測定
5.2.9	コメット画像解析
5.2.10	統計解析
5.3	実験結果と考察
5.3.1	繊維芽細胞による実験
5.3.2	マクロファージによる実験
5.4	まとめ
6	付録2 DNA 電気泳動実験
6.1	本研究の背景
6.2	材料と方法
6.2.1	実験に用いた化学物質
6.2.2	プラスミド処理
6.2.3	磁場曝露
6.2.4	電気泳動
6.2.5	観察
6.2.6	解析方法
6.2.7	統計解析
6.3	実験結果
6.4	まとめ
7	結論
8	付記
9	参考文献

## 概 要

### 研究の背景と目的

近年における、電子機器の著しい使用増加に伴って、低周波磁場（1 - 300 kHz）の健康影響についての関心が増している。環境磁場としての低周波磁場と生体物質との相互作用は、生体が持つ熱エネルギーに比べて低く、またその変動時間は生体内の化学反応速度と比べて遅いため、生体へ影響を与えないと考えられている。その一方で、低周波磁場による生体影響として、いわゆる遺伝毒性が報告されてきた。遺伝毒性の本質

は DNA 損傷であるが、これは発がん性を誘導するため、生体にとって大きなリスクとなりうる。国際がん研究機関 (IARC) は、低周波磁場には発がん性リスクの可能性があることを報告している。一般的に、DNA 損傷は放射線、紫外線によって水分子からラジカルが生成されることで起こされることが知られているが、低周波磁場のエネルギーは低く、直接 DNA 損傷を引き起こすことはできない。

一方、DNA 損傷を引き起こす原因の一つとして、酸化ストレスが知られている。この酸化ストレスは多くの場合、ラジカルによって誘導される。磁場のラジカル反応へ与える影響については、地磁気を感じ取る渡り鳥の研究から Schulten らによって明らかにされてきた。それによると渡り鳥の目の中の青色光受容体が光励起されるとラジカル対が生じる。このラジカルが、再結合するレートに、地磁気が影響を与え、その結果としてラジカル対が関与する光受容反応レートが変化するという可能性が示されてきた。したがって、低周波磁場は酸化ストレスに関与する形で DNA 損傷の誘導を促進していることが考えられる。

上に述べたように、DNA 損傷には、ラジカルあるいは、より広くは酸化ストレスが関与する。ラジカルが DNA 損傷を誘導する過程に、低周波磁場が影響を与える可能性が疑われている。低周波磁場が生体へ影響を与えるメカニズムは、まだ解明されていないが、Lai らによって、低周波磁場による DNA の損傷度がラジカル消去剤を用いることで、抑制されることが報告された[1]。この仮説を元に Lai らは、以下の二段階のプロセスを主とする一つの仮説を提唱した。1) DNA 損傷を引き起こすラジカルとしてヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) がある。この  $\cdot\text{OH}$  を過酸化水素と二価鉄から生成する反応として Fenton 反応が知られているが、低周波磁場はこれを促進する。2)  $\cdot\text{OH}$  はまた脂質の過酸化を通じて一酸化窒素 (ラジカル) 産生量 ( $\text{NO}$ ) を増加させ、これにより誘導される鉄貯蔵タンパク質からの鉄イオン放出が Fenton 反応をフィードバック的に増強させる。私はこの仮説に興味を持ち、検証することを目指した。

## 各章の内容、実験結果

第一章では酸化ストレスが生体影響と磁場影響の関連とそれを導く Lai らのスキームを詳しく述べる。第二章では 50-Hz 磁場が線維芽細胞 (Swiss Albino 3T3) の DNA 損傷を促進する作用に関する実験結果を述べる。実験では 500- $\mu\text{T}$ 、1000- $\mu\text{T}$  磁場を 2~24 時間曝露し、DNA 損傷度をコメットアッセイ (単一細胞ゲル電気泳動法) によって測定した。その結果、1000- $\mu\text{T}$  磁場を 24 時間連続曝露することによって DNA 二本鎖切断量が有意に増加した。また、断続波形磁場を 18 時間曝露することによって、DNA 一本鎖切断量が有意に増加した。断続波形を用いて得られた結果は先行研究[2]と類似のものである。これにより、低周波磁場に DNA 損傷作用があることが確認された。

第三章では、Lai の仮説を検証するために、免疫細胞マクロファージ (RAW264) を用いて 50-Hz 磁場曝露による  $\text{NO}$  産生量、DNA 損傷度、細胞死を調べた結果を述べる。Lai の研究と異なる点は、LPS による酸化ストレス誘導を行ったことである。免疫細胞を LPS 刺激すると  $\text{NO}$  合成酵素発現量が増加し、結果的に  $\text{NO}$  (酸化ストレス源) 産生量が増加し、細胞内酸化ストレスも増加することが知られている。このことを利用して、マクロファージへの LPS 刺激を行い、その後さらに 500- $\mu\text{T}$  磁場を 24 時間曝露したのちに、上記の指標を測定した。その結果、DNA 損傷度とネクロシス (細胞の突発死) は、LPS 刺激によって促進され、50-Hz 磁場曝露によって更に増加した。一方で、50-Hz 磁場曝露による  $\text{NO}$  産生量の有意な増加は測定されなかった[3]。したがって、 $\text{NO}$  による酸化ストレスは 50-Hz 磁場曝露による DNA 損傷や細胞死の直接原因ではないことが示唆された。

第 4 章では DNA 損傷を引き起こしうる他の酸化ストレス分子の可能性を検討した結果を述べる。酸化ストレス分子として  $\text{NO}$  以外に  $\text{O}_2\cdot^-$  や  $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{ONOO}^-$  がある。このうち  $\cdot\text{OH}$  と  $\text{ONOO}^-$  は酸化力が高いことが知られているが、 $\cdot\text{OH}$  は DNA 損傷を引き起こすには寿命が短すぎるため、 $\text{ONOO}^-$  に着目した。 $\text{ONOO}^-$  は  $\text{NO}$  と  $\text{O}_2$  の反応によ

って生成される。そこで、私は $\text{O}_2^-$ 産生量増加経路へ低周波磁場が作用した可能性を考えた。先行研究において、50-Hz 磁場が $\text{O}_2^-$ 産生を促進することが示されている[4]。 $\text{O}_2^-$ は、ミトコンドリアの ATP 合成の過程で、恒常的に放出されている。本研究では、このミトコンドリア膜から生成される $\text{O}_2^-$ に磁場曝露が与える影響に着目し、測定した。その結果、マクロファージへ 500- $\mu\text{T}$  磁場を 24 時間曝露することによって、細胞内の $\text{O}_2^-$ 産生量が増加した。ミトコンドリアが機能不全を起こすと膜の中と外の電位差 ( $\Delta\Phi_m$ ) が低下し、放出される $\text{O}_2^-$ は増加する。実際に、 $\Delta\Phi_m$ を測定したところ磁場曝露によって、有意な低下が測定された。一方、ミトコンドリア膜電位を低下させることが知られている FCCP (イオノフォア) の存在下で測定を行った結果、 $\text{O}_2^-$ 産生量が増加したことから、50-Hz 磁場曝露による  $\Delta\Phi_m$ 低下が $\text{O}_2^-$ 産生量を増加させるということが分かった。 $\Delta\Phi_m$ 低下によるミトコンドリア機能不全が起こるとアポトーシス (プログラム細胞死) を誘導する。これはミトコンドリアからシトクロム c が放出され、アポトーシスを誘導する酵素カスパーゼを活性化するためである。実際に、50-Hz 磁場曝露によりカスパーゼが活性化される傾向が示された。本研究と先行研究の知見を合わせると、50-Hz 磁場のターゲットの候補としては a)  $\text{O}_2^-$ の産生と消去に関係する酵素 (前者として NADPH oxidase、後者として superoxide dismutase が知られている) の活性、b) ミトコンドリア膜における電子伝達系の 2 つが考えられる。前者に関して、50-Hz 磁場が superoxide dismutase の活性を抑制するという報告がある。また後者に関しては、時間的に変動する磁場により膜上に非常に微小ではあるが渦電流が発生する可能性が理論的に指摘されている。これが電子伝達系に影響した可能性が考えられる。しかし、前者に関しては報告が少なく、後者については実験的研究はない。従って、これらの仮説の検証は今後の課題である。

## 結論

本研究から、低周波磁場によるミトコンドリア膜電位低下によって $\text{O}_2^-$ 生成経路促進にされること、また、遺伝毒性、細胞毒性を誘導することが示された。この結果から、低周波磁場はミトコンドリア膜や $\text{O}_2^-$ 産生を通じて生体へ作用するという仮説を新たに提唱した。

## 参考文献

- [1] Lai, H., & Singh, N. P. (2004). Environ. Health Perspect. 112(6), 687.
- [2] Nakayama, M., Hondou, T., Miyata, H. (2014). In Proceedings of APPC12 p. 012057.
- [3] Nakayama, M., Nakamura, A., Hondou, T., Miyata, H. (2016). Int J Radiat Biol 92(10), 583-589
- [4] Simkó, M., Droste, S., Kriehuber, R., Weiss, D. G. (2001). Eur J Cell Biol 80(8), 562-566.

## 論文審査の結果の要旨

近年における電子機器使用の著しい増加に伴い、低周波磁場（1-300 kHz）の健康影響についての関心が高まっている。低周波磁場と生体物質との相互作用エネルギーは熱エネルギーに比べて著しく低いが、低周波磁場に起因する DNA 損傷が報告されるようになってきている。DNA 損傷は発がんにつながるため、大きなリスクとなりうる。一般的に、生体における DNA 損傷はラジカルを含む酸化ストレスに起因することから、低周波磁場が生体の酸化ストレスを促進して DNA 損傷を誘導する可能性が以前から指摘されてきた。実際脳神経細胞において 50Hz 磁場による DNA 損傷がラジカル消去剤を用いることで抑制されることが Lai らの実験で示された。彼らは、低周波磁場が細胞内鉄貯蔵タンパク質からの鉄イオン放出を増加させ、これが最終的に一酸化窒素（NO；ラジカル）の産生量増加を引き起こし、フィードバック的に鉄イオン増加をもたらすという仮説を提唱した。中山氏はこの仮説に興味を持ち、その検証を目指した。

以下に本研究の主な成果を述べる

（１）免疫細胞マクロファージを用い、NO 産生量、DNA 損傷度、細胞死を磁場曝露応答の指標として研究した。細胞を細菌内毒素 LPS によって刺激し、NO 産生を大幅に上昇させて酸化ストレス誘導を行った。LPS 刺激／無刺激マクロファージを 500 $\mu$ T、50Hz 磁場に 24 時間曝露後に、上記指標を測定した。その結果、DNA 損傷度と細胞死は 50Hz 磁場曝露により更に増加した。一方、NO 産生量は増加しなかった。したがって、50Hz 磁場曝露による DNA 損傷や細胞死の原因が NO の化ストレス以外である可能性が示唆され、Lai の仮説の妥当性に一石を投じた。

（２）中山氏はさらに LPS 刺激されない細胞についてミトコンドリア由来のラジカル分子  $O_2^-$  とミトコンドリア内外の電位差（ $\Delta\Phi_m$ ）の関与を検討した。 $\Delta\Phi_m$  を脱共役剤で低下させると  $O_2^-$  が増加することをヒントに、指示薬 NBT で  $O_2^-$  を、JC-1 にて  $\Delta\Phi_m$  をそれぞれ測定した。その結果、磁場曝露によって  $\Delta\Phi_m$  が低下し、 $O_2^-$  は増加した。従って 50Hz 磁場曝露→ミトコンドリア膜電位低下→ $O_2^-$  産生増加という一連の流れが初めて示された。 $O_2^-$  は NO と反応して DNA 損傷性のラジカル ONOO $^-$  を産生するが、LPS 刺激無しでは DNA 損傷が増加しなかった。これは NO 産生が低かったためと説明された。

本研究は LPS 刺激細胞における 50Hz 磁場に起因する DNA 鎖損傷が Lai の仮説とは別の原因で起こる可能性を示し、また LPS 非刺激細胞では 50Hz 磁場曝露→ミトコンドリア膜電位低下→ $O_2^-$  産生増加という流れの存在を初めて示した。これらはいずれも電磁場の生体影響研究分野において重要な進歩で、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な高度の研究能力と学識を有していることを示す。よって本論文は博士論文として合格と認める。